

DOCKET NO.: 260449US0XPCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Pedro ALVES
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION
FILED: HERewith
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/01280
INTERNATIONAL FILING DATE: April 23, 2003
FOR: EPHA2 ANTIGEN T EPITOPES

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
France	02 05048	23 April 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/01280. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

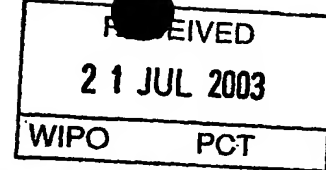
(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

10/511273

R E P U B L I Q U E F R A N C A I S E



BEST AVAILABLE COPY



PCT/FR03/01280

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 25 AVR. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

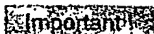
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2



Remplir impérativement la 2ème page.

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 190600

REMISE DES PIÈCES DATE 20 AVRIL 2002 LIEU 70 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0205048 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 23 AVR. 2002 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6 avenue de Messine 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) MJPsts598/69FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) EPI TOPES T DE L'ANTIGENE EPHA2			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	101 rue Tolbiac	
	Code postal et ville	75654 PARIS CEDEX 13	
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 20 AVRIL 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0206048 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		MJPsts598/69FR	
6 MANDATAIRE			
Nom		VIALLE-PRESLES	
Prénom		Marie-José	
Cabinet ou Société		CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	6 avenue de Messine	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>			
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1	
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) VIALLE-PRESLES Marie-José (93-2009)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
Page suite N° 1.../1...

REMISE DES PIÈCES DATE 23 AVRIL 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0205048		Réservé à l'INPI		Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire		DB 829 W / 260899	
Vos références pour ce dossier (facultatif)				MJPsts598/69FR			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE				Pays ou organisation			
				Date		N°	
				Pays ou organisation			
				Date		N°	
				Pays ou organisation			
				Date		N°	
5 DEMANDEUR							
Nom ou dénomination sociale				INSTITUT GUSTAVE ROUSSY			
Prénoms							
Forme juridique							
N° SIREN							
Code APE-NAF							
Adresse		Rue		39 rue Camille Desmoulins			
		Code postal et ville		94805		VILLEJUIF Cedex	
Pays				FRANCE			
Nationalité				Française			
N° de téléphone (facultatif)							
N° de télécopie (facultatif)							
Adresse électronique (facultatif)							
5 DEMANDEUR							
Nom ou dénomination sociale							
Prénoms							
Forme juridique							
N° SIREN							
Code APE-NAF							
Adresse		Rue					
		Code postal et ville					
Pays							
Nationalité							
N° de téléphone (facultatif)							
N° de télécopie (facultatif)							
Adresse électronique (facultatif)							
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)				VIALLE-PRESLES Marie-José (93-2009) 			
				VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

La présente invention est relative à des peptides dérivés de la protéine EphA2 et à leur utilisation en immunothérapie antitumorale.

La vaccination ou immunothérapie peptidique est une
5 approche thérapeutique qui fait actuellement l'objet d'un grand intérêt dans le cadre de la prévention ou du traitement des cancers. Son principe repose sur l'immunisation par des peptides reproduisant des épitopes T d'antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), qui jouent
10 un rôle majeur dans l'élimination des cellules cancéreuses exprimant ces antigènes à leur surface.

On rappellera que les CTL ne reconnaissent pas les antigènes protéiques entiers, mais des fragments peptidiques de ceux-ci, présentés par les molécules du complexe majeur
15 d'histocompatibilité (CMH) exprimées à la surface de différentes cellules. Ce sont ces fragments peptidiques qui constituent les épitopes T.

La présentation de ces peptides résulte d'un processus complexe, dénommé « apprêtement de l'antigène », qui
20 implique 3 étapes principales :

- la dégradation cytosolique des antigènes par un complexe multienzymatique dénommé protéasome ;
- la translocation des peptides issus de cette dégradation dans le réticulum endoplasmique (RE) par les
25 transporteurs TAP ;
- l'association de ces peptides avec le CMH pour former des complexes stables peptide/CMH, qui seront exportés à la surface cellulaire.

La présentation des épitopes T à la surface
30 cellulaire dépend notamment de la stabilité de la protéine antigénique dans le cytosol, des sites et de la fréquence des coupures effectuées par le protéasome, de l'efficacité de la translocation dans le RE par les transporteurs TAP, et de la capacité des peptides à se fixer aux molécules du CMH et à
35 former des complexes peptide/CMH stables.

Les épitopes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) ont généralement 8 à 11 acides aminés, et sont reconnus par les cellules T CD8+,

qui représentent la composante majeure de la réponse cytotoxique. Les épitopes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) ont généralement 13 à 18 acides aminés et sont reconnus par les cellules T CD4+.

5 L'identification de ces épitopes, et notamment (compte tenu du rôle essentiel de la réponse CD8+ dans la cytotoxicité) de ceux présentés par le CMH I, constitue donc une étape essentielle pour le développement de compositions d'immunothérapie anti-tumorale.

10 De nombreux antigènes tumoraux capables d'induire une réponse CTL sont connus à l'heure actuelle. Certains des épitopes T de ces antigènes ont été identifiés, et l'efficacité de vaccins à base de peptides reproduisant ces épitopes T a été montrée dans de nombreux cas. Cependant, 15 l'expression de la majorité de ces antigènes est restreinte à certains types histologiques de tumeurs, ce qui limite leur utilisation clinique. Il est donc souhaitable d'identifier d'autres antigènes tumoraux exprimés par un grand nombre de tumeurs d'origine variée, et qui soient en outre capables 20 d'induire une réponse immunitaire cytotoxique antitumorale.

Le récepteur EphA2, précédemment dénommé ECK (LINDBERG et HUNTER, Molec. Cell. Biol. 10, 6316-6324, 1990), est un récepteur membranaire, possédant une activité tyrosine kinase. Il comprend un domaine extracellulaire de 534 acides aminés, un domaine transmembranaire de 24 acides aminés, et un 25 domaine cytoplasmique de 418 acides aminés qui contient le domaine tyrosine kinase. Ce récepteur est surexprimé dans plusieurs types de cancer tels que le cancer du colon, du sein, de la prostate, du poumon, de l'estomac, de l'œsophage 30 ainsi que le mélanome métastatique, mais n'est pas surexprimé dans des lésions non cancéreuses de ces mêmes tissus (ROSENBERG et al. Am. J. Physiol. 273, 824, 1997; ZELINSKI et al. Cancer Res. 61, 2301, 2001; NEMOTO et al. Pathobiology 65, 195, 1997, EASTY et al. Int. J. Cancer 60, 129, 1995; WALKER 35 DANIEL et al. Prostate 41, 275, 1999). Il a été observé que la surexpression d'EphA2 était liée à la transformation maligne et facilitait la progression métastatique des tumeurs. De

plus, EphA2 joue un rôle important dans la néovascularisation tumorale (OGAWA et al. Oncogene 19, 6043, 2000).

5 Du fait de sa surexpression dans de nombreux types de tumeurs, et de son implication dans la transformation maligne et dans l'angiogenèse tumorale, il a été proposé d'utiliser EphA2 comme cible de traitement antitumoraux. Ainsi, la Demande PCT WO 01/121172 propose l'utilisation d'anticorps dirigés contre des épitopes B portés par le domaine extracellulaire du récepteur EphA2 pour
10 l'immunothérapie antitumorale passive.

Cependant, on ignorait jusqu'à présent si EphA2 pouvait être apprêté efficacement pour générer des épitopes T capables d'induire une réponse cytotoxique antitumorale. A fortiori, aucun épitope T de cet antigène n'avait été
15 identifié.

Les Inventeurs ont maintenant identifié dans EphA2 des peptides immunogènes présentés par le CMH I, et induisant des lymphocytes T cytotoxiques capables de lyser des cellules tumorales exprimant EphA2.

20 La présente invention a en conséquence pour objet un peptide immunogène constituant un épitope T présenté par le CMH I, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de 8 à 11 acides aminés consécutifs de l'antigène EphA2.

Les Inventeurs ont en particulier identifié deux
25 peptides, dénommés ci-après p58 et p550, présentés par HLA-A*0201.

La séquence (code 1 lettre) de ces peptides est la suivante :

p58 : IMNDMPIYM ;

30 p550 : VLAGVGFFI.

Ces peptides sont capables d'induire une réponse CTL spécifique vis-à-vis de cellules HLA-A*0201 exprimant EphA2. Ils induisent notamment une réponse cytotoxique vis-à-vis de cellules tumorales HLA-A*0201 issues de tumeurs de
35 types variés.

La présente invention a également pour objet des compositions comprenant au moins un peptide immunogène

conforme à l'invention, ou une molécule d'acide nucléique codant pour ledit peptide.

Il peut s'agir de compositions multiépitopiques, capables de générer une réponse CTL polyspécifique, et qui dans ce but comprennent également un ou plusieurs autre(s) épitope(s) immunogène(s). Ces autres épitopes peuvent être issus d'EphA2, ou d'un ou plusieurs autres antigènes.

Ces compositions multiépitopiques conformes à l'invention peuvent comprendre, pour être largement utilisables sur une population dont les individus portent des allèles HLA différents, des épitopes présentés par différentes molécules du CMH I. Elles peuvent également comprendre en outre au moins un épitope présenté par une molécule du CMH II, et capable d'induire une réponse T auxiliaire.

Selon un mode de réalisation préféré d'une composition conforme à l'invention, elle comprend au moins un polypeptide chimérique comprenant une ou plusieurs copies d'un peptide immunogène conforme à l'invention. Dans le cas d'une composition multiépitopique, ledit polypeptide chimérique comprend en outre une ou plusieurs copies d'au moins un autre épitope immunogène.

Un tel polypeptide chimérique peut être facilement obtenu par des méthodes connues en elles-mêmes, et notamment par les techniques classiques de l'ADN recombinant.

La présente invention a également pour objet les molécules d'acide nucléique codant pour un peptide immunogène ou pour un polypeptide chimérique conforme à l'invention.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un épitope peptidique immunogène, d'une composition, ou d'une molécule d'acide nucléique conforme à l'invention pour l'obtention d'un médicament, et notamment d'un médicament destiné à l'immunothérapie antitumorale, et en particulier au traitement de tumeurs exprimant EphA2.

Ceci englobe une grande variété de tumeurs, parmi lesquelles on citera notamment les tumeurs du colon, du sein, de la prostate, du poumon, de l'estomac, du rein, et de l'œsophage.

Les peptides p58 et p550 sont notamment utilisables pour l'obtention de médicaments destinés au traitement de patients HLA-A*0201.

La présente invention englobe également les médicaments comprenant, en tant que principe actif, au moins un peptide immunogène, une composition, ou une molécule d'acide nucléique conforme à l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, lesdits médicaments sont des vaccins.

Des médicaments conformes à l'invention peuvent comprendre en outre les excipients usuels, ainsi que des adjuvants habituellement utilisés en immunothérapie, et permettant par exemple de favoriser l'administration du principe actif, de le stabiliser, d'augmenter son immunogénicité, etc.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant l'induction d'une réponse cytotoxique antitumorale par des peptides conformes à l'invention issus de l'antigène EphA2.

EXEMPLE 1 : IDENTIFICATION D'EPITOPES D'EPHA2 PRESENTES PAR LA MOLECULE HLA-A*0201.

La séquence d'acides aminés de la protéine EphA2 a été analysée à l'aide du logiciel BIMAS (PARKER et al., J. Immunol. 152, 163, 1994), afin d'identifier des peptides potentiellement capables de se lier à HLA-A*0201. Parmi les épitopes potentiels identifiés, les deux peptides suivants :

p58 : IMNDMPIYM ;

p550 : VLAGVGFFI ;

ont été sélectionnés.

Les peptides correspondant à ces séquences ont été synthétisés par SYNT:EM (Nîmes, France). La pureté (>85%) est contrôlée par chromatographie liquide à haut rendement en phase inverse. Les peptides sont lyophilisés, puis dissous dans du DMSO à 10 mg/mL et stockés à -80°C.

L'immunogénicité de ces peptides a été évaluée par la mesure de leur affinité pour HLA-A*0201. Celle-ci est définie par deux paramètres : l'affinité relative (RA) qui

reflète la capacité des peptides à se fixer à HLA-A*0201, et la vitesse de dissociation des complexes HLA-A*0201/peptide (DC_{50}) qui témoigne de leur stabilité. Les peptides à affinité élevée ($RA < 5$ et $DC_{50} > 2$ hrs), sont potentiellement immunogènes, contrairement aux peptides à faible affinité ($RA > 5$ et $DC_{50} < 2$ hrs).

Affinité relative :

Des cellules T2 (FIRAT et al., Eur. J. Immunol., 29, 3112, 1999) (3×10^5 cellules/mL) humaines, qui sont déficientes en transporteurs TAP, sont incubées à 37°C pendant 16 heures avec diverses concentrations (100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M) de chaque peptide à tester dans du milieu RPMI 1640 sans sérum, supplémenté avec 100 ng/mL de β 2-microglobuline humaine. Ensuite, elles sont lavées deux fois, et marquées avec l'anticorps monoclonal BB7.2 (PARHAM et al., Hum. Immunol., 3, 4, 277-299, 1981) qui est spécifique de la molécule HLA-A*0201, puis avec un anticorps de chèvre anti-Ig de souris, couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie de flux. Pour chaque concentration de peptide, la fluorescence spécifique de HLA-A*0201 est calculée en tant que pourcentage de la fluorescence obtenue avec 100 μ M d'un peptide de référence (HIVpol 589 ; IVGAETFYV). L'affinité relative (RA) est définie comme le rapport de la concentration de chaque peptide induisant 20% de la fluorescence obtenue avec 100 μ M du peptide de référence, à la concentration du peptide de référence induisant 20% de la fluorescence obtenue avec 100 μ M dudit peptide de référence. Plus l'affinité relative est faible, et plus fortement le peptide se lie à HLA-A*0201. La RA moyenne pour chaque peptide est déterminée à partir d'au moins trois expériences indépendantes. Dans toutes les expériences, 20% de la fluorescence maximale ont été obtenus pour 1 à 3 μ M du peptide de référence.

Stabilité :

Des cellules T2 (10^6 /mL) sont incubées pendant une nuit à 37°C avec 100 μ M de chaque peptide à tester dans du milieu RPMI 1640 sans sérum, supplémenté avec 100 ng/mL de β 2-microglobuline humaine. Ensuite, elles sont lavées à quatre

reprises pour éliminer les peptides libres, incubées avec du BREFELDIN A (SIGMA ; 10 µg/mL) pendant une heure pour prévenir l'expression à leur surface des molécules HLA-A*0201 nouvellement synthétisées, lavées et incubées à 37°C pendant 0, 2, 4, 6 ou 8 heures en présence de BREFELDIN A (0,5 µg/mL). Pour chaque temps d'incubation, les cellules sont ensuite marquées, comme indiqué ci-dessus, avec l'anticorps BB7.2, et analysées en cytométrie de flux pour évaluer la quantité de complexe peptide/HLA-A*0201 présent à leur surface. Cette quantité est évaluée par la formule : (fluorescence moyenne des cellules T2 préincubées avec le peptide - fluorescence moyenne des cellules T2 traitées dans des conditions similaires en l'absence de peptide). Le DC₅₀ (complexe de dissociation : DC) est défini comme étant le temps (en heures) requis pour la perte de 50% des complexes HLA-A*0201/peptide stabilisés à t=0.

Les résultats de ces expérimentations sont présentés dans le Tableau I ci-après.

Tableau I

Peptide	Séquence	RA	DC ₅₀
p58	IMNDMPIYM	1	4
p550	VLGVGFPI	1	4-6

Ces résultats montrent que les peptides p58 et p550 possèdent une affinité de liaison importante (RA = 1) et forment des complexes stables (DC₅₀= 4h et 4 à 6 h respectivement).

EXEMPLE 2 : IMMUNOGENICITE DES PEPTIDES P58 ET P550 :

Induction de CTL spécifiques par vaccination avec les peptides

L'immunogénicité des peptides p58 et p550 a été évaluée par génération de CTL sur des souris transgéniques HHD (PASCOLO et al., J. Exp. Med., 185, 2043, 1997). Ces souris sont $\beta 2m^{-/-}$, $D^b^{-/-}$ et expriment une monochaine HLA-A*0201 composée des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de HLA-A*0201 et des domaines $\alpha 3$ et intracellulaire de D^b , reliée par son extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale de la $\beta 2$ -microglobuline humaine par un peptide de 15 acides aminés.

Les souris HHD reçoivent une injection sous-cutanée à la base de la queue avec 100 µg de chaque peptide à tester émulsifié dans de l'adjuvant incomplet de Freund, en présence

de 140 µg d'un épitope auxiliaire T dérivé de l'antigène « core » de HBV (128-140, séquence TPPAYRPPNAPIL).

Après 11 jours, des cellules spléniques prélevées sur les souris (5×10^7 cellules dans 10 mL) sont stimulées *in vitro* avec le peptide à tester (10 µM). Au 6ème jour de culture, les populations qui répondent sont testées pour déterminer une cytotoxicité spécifique. Les cellules qui répondent sont restimulées *in vitro* à des intervalles d'une semaine avec 2×10^7 cellules spléniques HHD irradiées (3000 rads) et 1 à 0,1 µM de peptide en présence de 50 UI/mL d'IL2 recombinante (PROLEUKIN, CHIRON CORP).

Des essais de cytotoxicité sont effectués 6 jours après la dernière stimulation.

Des cellules RMA-S-HHD sont utilisées comme cibles pour étudier la cytotoxicité. Ces cellules sont obtenues par transfection de cellules RMA-S murines avec la construction HHD comme décrit par PASCOLO et al. (J. Exp. Med., 185, 2043, 1997).

Ces cellules-cibles sont marquées avec 100 µCi de ^{51}Cr pendant 90 minutes, puis lavées trois fois et étalées dans des plaques de 96 puits à fond rond (3×10^3 cellules/puits dans 100 µl de RPMI 1640 + 3% de sérum de veau fœtal). Elles sont chargées avec 1 µM du peptide à tester, ou d'un peptide témoin non-pertinent, à 37°C pendant 90 minutes.

Ensuite, 100 µl des cellules effectrices (rapport cellules effectrices/cellules cible = 40/1) sont ajoutés dans les puits et les plaques sont incubées à 37°C pendant 4 heures. Après incubation, 100 µl de surnageant sont collectés et la radioactivité est mesurée dans un compteur γ.

Le pourcentage de lyse spécifique est calculé par la formule : $\left[\frac{\text{libération de } ^{51}\text{Cr expérimentale} - \text{libération de } ^{51}\text{Cr spontanée}}{\text{libération de } ^{51}\text{Cr maximale} - \text{libération de } ^{51}\text{Cr spontanée}} \right] \times 100$. Dans toutes les expériences, la libération spontanée est inférieure à 20% de la libération maximale induite par HCl 3N.

Les résultats de ces expérimentations sont illustrés par la Figure 1A.

□ : peptide non-pertinent ;

■ : peptide EphA2.

Ces résultats montrent que l'immunisation par le peptide p58 ou p550 génère des CTL qui tuent les cibles RMAS-HHD chargées avec ce même peptide, mais pas les cellules chargées avec le peptide non-pertinent.

Des lignées de CTL, respectivement dénommées mCTL58 et mCTL550 ont été établies, à partir des cellules spléniques de souris HDD immunisées avec le peptide p58 ou p550, par stimulation répétées *in vitro* avec des concentrations décroissantes ($10 \mu\text{M}$ - $1 \mu\text{M}$) du même peptide.

L'avidité de ces lignées pour leur peptide inducteur a été déterminée en mesurant, comme décrit ci-dessus, leur cytotoxicité vis-à-vis de cellules cibles RMAS-HHD chargées avec des concentrations croissantes (1 pM à $10 \mu\text{M}$) du peptide concerné.

Les résultats sont illustrés par la Figure 1 B.

Ces résultats montrent que les deux lignées mCTL58 et mCTL550 possèdent une avidité relativement élevée ; on obtient 50% de la lyse maximale pour des concentrations de peptide de 10^{-8} M dans le cas de mCTL58, et de $2 \times 10^{-8} \text{ M}$ dans le cas de mCTL550

EXEMPLE 3 : RECONNAISSANCE DES EPITOPES APPRETES NATURELLEMENT DE L'ANTIGENE EPHA2 PAR DES CTL INDUITES PAR LES PEPTIDES P58 OU P550

Pour tester si les peptides p58 et p550 constituaient des épitopes apprêtés naturellement de l'antigène EphA2, la réponse des cellules des lignées mCTL58 et mCTL550 à des cellules exprimant cet antigène a été évaluée de deux manières différentes.

1) Stimulation par des cellules COS-7 transfectées exprimant EphA2.

Les cellules des lignées mCTL58 et mCTL550, sont stimulées avec des cellules COS-7 de singe co-transfectées avec la construction HHD (PASCOLO et al. précité) et un plasmide contenant l'ADNc de EphA2. A titre de témoins négatifs on utilise des cellules COS-7 transfectées soit avec la construction HHD seule, soit avec le plasmide contenant l'ADNc de EphA2 seul.

La stimulation des CTL est évaluée par mesure de leur sécrétion de $\text{TNF-}\alpha$. A titre de témoin positif, on utilise les cellules COS-7 transfectées avec la construction HHD et chargées avec le peptide p58 ou p550.

5 4 jours après la transfection, les cellules COS-7 sont mises en contact avec les cellules mCTL58 et mCTL550 à raison de 5×10^4 CTL pour 3×10^4 cellules COS-7 dans du RPMI 1640 en présence de 10% SVF.

10 Après 6 heures d'incubation, le surnageant est prélevé (50 μL), et mis en contact avec des cellules de fibrosarcome de souris WEHI164 clone 13 (3×10^4 par puits) qui se caractérisent par une forte sensibilité à l'apoptose induite par le $\text{TNF-}\alpha$. Afin de quantifier la teneur en TNF des surnageants de culture, une gamme étalon de $\text{TNF-}\alpha$
15 (concentrations de 0 à 10^4 pg/mL) est utilisée en parallèle. Après 16 heures d'incubation à 37°C , la viabilité des cellules WEHI-164 clone 13 est déterminée par un test colorimétrique au MTT (SIGMA) (ESPEVIK et NISSEN MEYER, J. Immunol. Methods., 95, 99, 1986).

20 Les résultats sont illustrés par la Figure 2.
EphA2 : cellules COS-7 transfectées par l'ADNc d'EphA2 seul ;
HHD : cellules COS-7 transfectées par la construction HHD seule ;
HHD + peptide : cellules COS-7 transfectées avec la
25 construction HHD et chargées avec le peptide p58 ou p550 ;
HHD+ EphA2 : cellules COS-7 transfectées avec la construction HHD et l'ADNc d'EphA2.

30 Ces résultats montrent que les lignées mCTL58 et mCTL550 répondent à la stimulation par les cellules COS co-exprimant HHD et EphA2.

En revanche, on n'observe aucune réponse aux cellules COS transfectées séparément par la construction HHD ou par l'ADNc d'EphA2.

35 2) Stimulation par des cellules tumorales humaines HLA-A*0201 exprimant EphA2.

Les lignées tumorales HLA-A*0201 suivantes ont été utilisées : SAOS (sarcome), 1355 (cancer du poumon), Caco-2 (cancer du colon), HIEG (carcinome rénal), LNCaP (cancer de la

prostate). La lignée DU145 (cancer de la prostate) n'exprimant pas HLA-A*0201 a également été utilisée à titre de témoin négatif.

5 Parmi ces lignées, DU145 et Caco-2 sont connues comme exprimant EphA2, et LNCaP comme n'exprimant pas EphA2.

L'expression d'EphA2 dans les autres lignées tumorales a été évaluée par transfert de Western. Le niveau d'expression EphA2 dans l'ensemble des lignées utilisées est résumé dans le Tableau II ci-dessous.

10

Tableau II

Lignée cellulaire	Expression HLA-A*0201	Expression EphA2
SAOS	+	+
1355	+	+
Caco-2	+	+
HIEG	+	+
LNCaP	+	-
DU145	-	+

+ : forte expression

- : pas d'expression.

15 Les lignées mCTL58 et mCTL550 ont été stimulées par les lignées tumorales SAOS, 1355, Caco-2, HIEG, LNCaP, et DU145 mentionnées ci-dessus. La stimulation est évaluée par détection de la sécrétion de TNF- α , comme décrit ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par les Figures 3A et 3B.

20 La figure 3A montre que les cellules mCTL58 et mCTL550 répondent à la stimulation par les cellules Caco-2, qui expriment HLA-A*0201 et EphA2, mais ne répondent ni aux cellules DU145 qui n'expriment pas HLA-A*0201 ni aux cellules LNCaP qui n'expriment pas EphA2.

25 La figure 3B montre que les cellules mCTL58 et mCTL550 répondent à la stimulation par les cellules HIEG, Caco-2, 1355 et SAOS qui expriment des quantités importantes d'EphA2, mais ne répondent pas aux cellules LNCaP qui n'expriment pas EphA2.

30 Les résultats des expérimentations ci-dessus montrent que les CTL induites par p58 ou p550 reconnaissent des épitopes apprêtés naturellement de l'antigène EphA2.

EXEMPLE 4 : INDUCTION DE CTL HUMAINS SPÉCIFIQUES DES PEPTIDES P58 OU P550.

La capacité de p58 et p550 à induire des CTL *in vitro* à partir de cellules mononucléées du sang périphérique (PMBC) de donneurs sains a été testée comme suit.

Les PMBC sont obtenues, à partir de prélèvements sanguins par leucocytophérèse sur des donneurs sains, après centrifugation à 2000 rpm pendant 20 min sur gradient de Ficoll/Hypaque (AMERSHAM). Après 3 lavages en NaCl 0,9%, 10^7 PBMC sont resuspendues dans chacun des puits d'une plaque de culture à 6 puits, dans 3 mL de milieu complet (RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum humain AB inactivé par la chaleur), et incubées à 37°C pendant 2 heures. Après incubation, les cellules non-adhérentes sont prélevées et les cellules adhérentes sont différenciées en cellules dendritiques par ajout dans chacun des puits de 3 mL de milieu complet contenant 50 ng/mL de GM-CSF (R & D SYSTEMS) et 1000 UI/mL d'IL-4 (R & D SYSTEMS). Après 7 jours de culture les cellules dendritiques sont collectées et chargées avec le peptide p58 ou p550 par incubation pendant 4 heures à 20°C avec 40 µg/mL de peptide en présence de 3 µg/mL de β2-microglobuline, puis irradiées à 4200 rads ; elles sont ensuite lavées pour éliminer le peptide libre. Des cellules CD8+ sont isolées à partir des cellules non-adhérentes à l'aide de microbilles couplées à un anticorps anti-CD8 (MILTENYI BIOTEC).

$0,5 \times 10^6$ cellules CD8+ sont stimulées par co-culture dans une plaque à 48 puits avec $2,5 \times 10^4$ cellules dendritiques chargées avec le peptide p58 ou p550, dans du milieu complet supplémenté avec 10ng/mL d'IL-7 dans un volume final de 500 µl/puits. Le jour suivant la mise en culture, on ajoute dans chacun des puits 10 ng/mL d'IL-10 humaine (R & D SYSTEMS) ; le deuxième jour, on ajoute dans chacun des puits 30 UI/mL d'IL-2 humaine. Le septième et le quatorzième jour après la première stimulation, les cellules CD8+ sont restimulées avec les cellules adhérentes chargées par 10 µg/mL de peptide en présence de 3 µg/mL de β2-microglobuline et irradiées. De l'IL-10 (10 ng/mL) et de l'IL-2 (30 UI/mL) sont

ajoutées respectivement 24 heures et 48 heures après restimulation. Sept jours après la seconde restimulation, la réponse de ces cellules à des cellules T2 chargées avec p58 ou p550 ou avec un peptide non-pertinent, ou à des cellules
5 tumorales HLA-A*0201 Caco-2 (exprimant EphA2 et HLA-A*0201), LNCaP (exprimant HLA-A*0201 et n'exprimant pas EphA2), et DU145 (exprimant EphA2 et n'exprimant pas HLA-A*0201) est évaluée par dosage de la production d'IFN γ intra-cellulaire.

Les cellules hCTL58 ou hCTL550 sont incubées avec
10 les cellules T2 chargées, ou avec les cellules de la lignée tumorale testée, en présence de 20 μ g/mL de BREFELDINE-A (SIGMA). Après 6 heures, elles sont lavées, marquées avec un anticorps anti-CD8 conjugué à la r-phycoérythrine (CALTAG LABORATORIES) dans du PBS pendant 25 min à 4°C, lavées et
15 fixées avec du paraformaldéhyde à 4%. Elles sont ensuite perméabilisées par de la saponine (SIGMA) à 0,2% dans du PBS, et marquées avec un anticorps monoclonal anti-IFN γ conjugué à l'allophycocyanine (PHARMINGEN).

Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie
20 de flux (FACSCaliburTM (BECTON DICKINSON) et logiciel CellQuestTM).

Les résultats (exprimés en nombre de cellules CD8+ productrices d'IFN γ pour 10⁵ cellules CD8+) sont illustrés par les Figures 4A et 4B.

La Figure 4A montre que les CTLs humains obtenus à partir de cellules CD8+ stimulées respectivement par le peptide p58 (hCTL58) ou le peptide p550 (hCTL550) sont activés par les cellules T2 chargées avec le peptide correspondant, et qu'on observe aucune activation par les cellules T2 chargées
30 avec le peptide non-pertinent.

La Figure 4B montre une réponse des CTLs hCTL58 et hCTL550 vis-à-vis de la lignée tumorale Caco-2 (EphA2⁺, HLA-A*0201⁺), mais pas vis-à-vis des lignées LNCaP (EphA2⁻, HLA-A*0201⁺) et DU145 (EphA2⁺, HLA-A*0201⁻).

Ces résultats démontrent que les peptides p58 ou p550 induisent des CTLs humains capables de reconnaître des cellules tumorales HLA-A*0201+ exprimant EphA2.

REVENDEICATIONS

1) Peptide immunogène constituant un épitope T
présenté par le CMH I, caractérisé en ce qu'il est constitué
par un fragment de 8 à 11 acides aminés consécutifs de
5 l'antigène EphA2.

2) Peptide immunogène selon la revendication 1,
caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- le peptide de séquence IMNDMPIYM ;
- le peptide de séquence VLAGVGFFI.

10 3) Polynucléotide codant pour un peptide selon
une quelconque des revendications 1 ou 2.

4) Composition comprenant au moins un peptide
selon une quelconque des revendications 1 ou 2, ou un
polynucléotide selon la revendication 3.

15 5) Composition selon la revendication 4,
caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition
multiépitopique comprenant en outre un ou plusieurs autre(s)
peptide(s) immunogène(s) ou un ou plusieurs polynucléotide(s)
codant pour le(s) dits peptide(s).

20 6) Composition selon la revendication 5,
caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide chimérique
comprenant au moins une copie d'un peptide selon une
quelconque des revendications 1 ou 2 et au moins une copie
d'un autre peptide immunogène, ou d'un polynucléotide codant
25 pour ledit polypeptide chimérique.

7) Utilisation d'un peptide selon une quelconque
des revendications 1 ou 2, d'un polynucléotide selon la
revendication 3, ou d'une composition selon une quelconque
des revendications 4 à 6, pour l'obtention d'un médicament.

30 8) Utilisation selon la revendication 7,
caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à
l'immunothérapie anti-tumorale.

9) Utilisation selon la revendication 8,
caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à
35 l'immunothérapie de tumeurs exprimant l'antigène EphA2.

10) Utilisation selon une quelconque des
revendications 7 à 9, caractérisée en ce que ledit médicament
est destiné au traitement de patients HLA-A*0201.

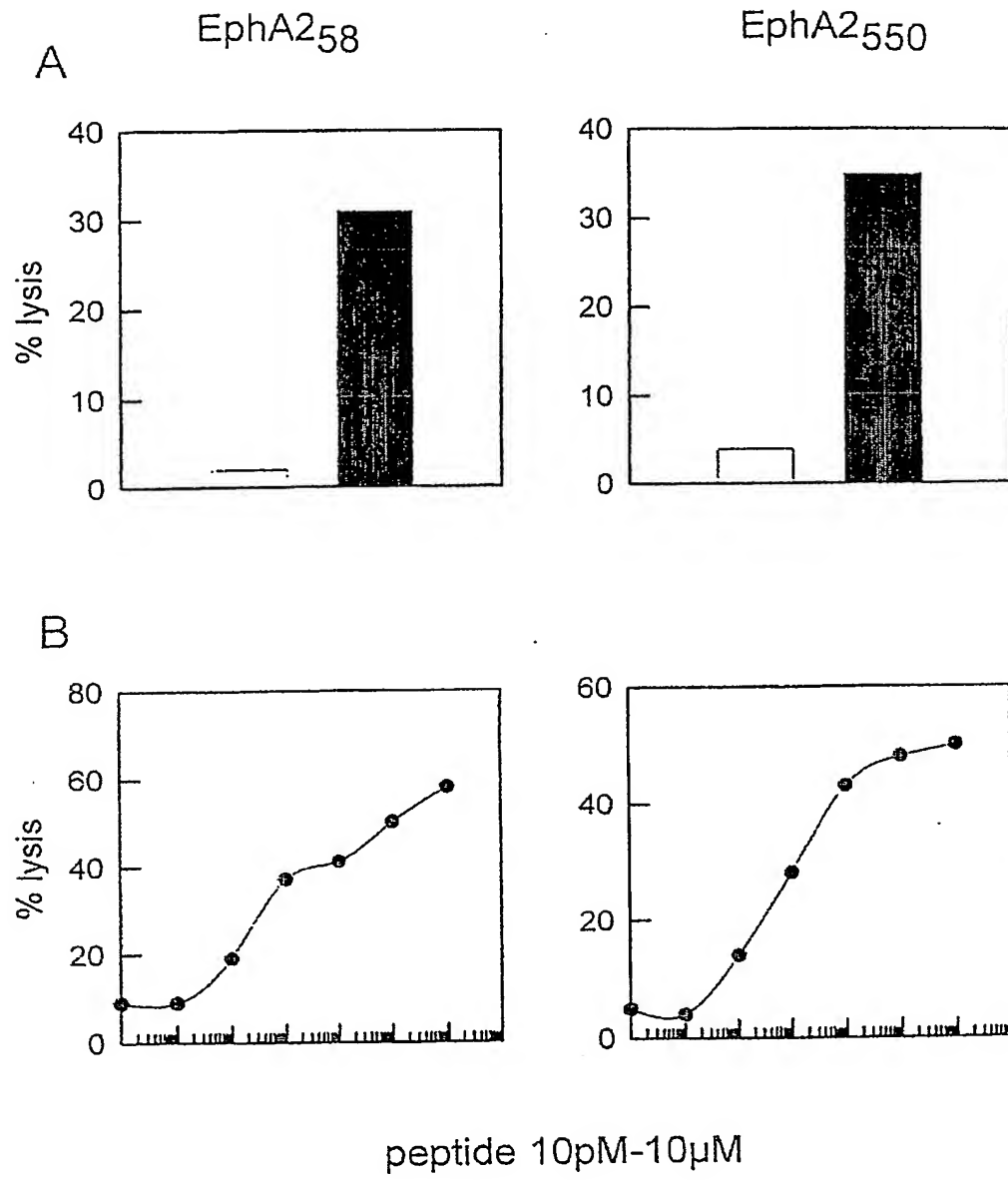


Fig. 1

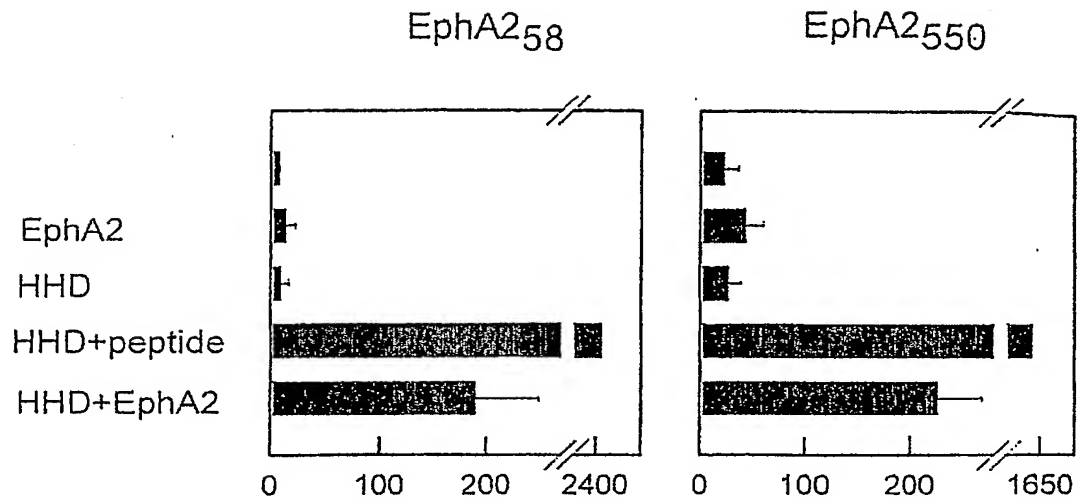


Fig. 2

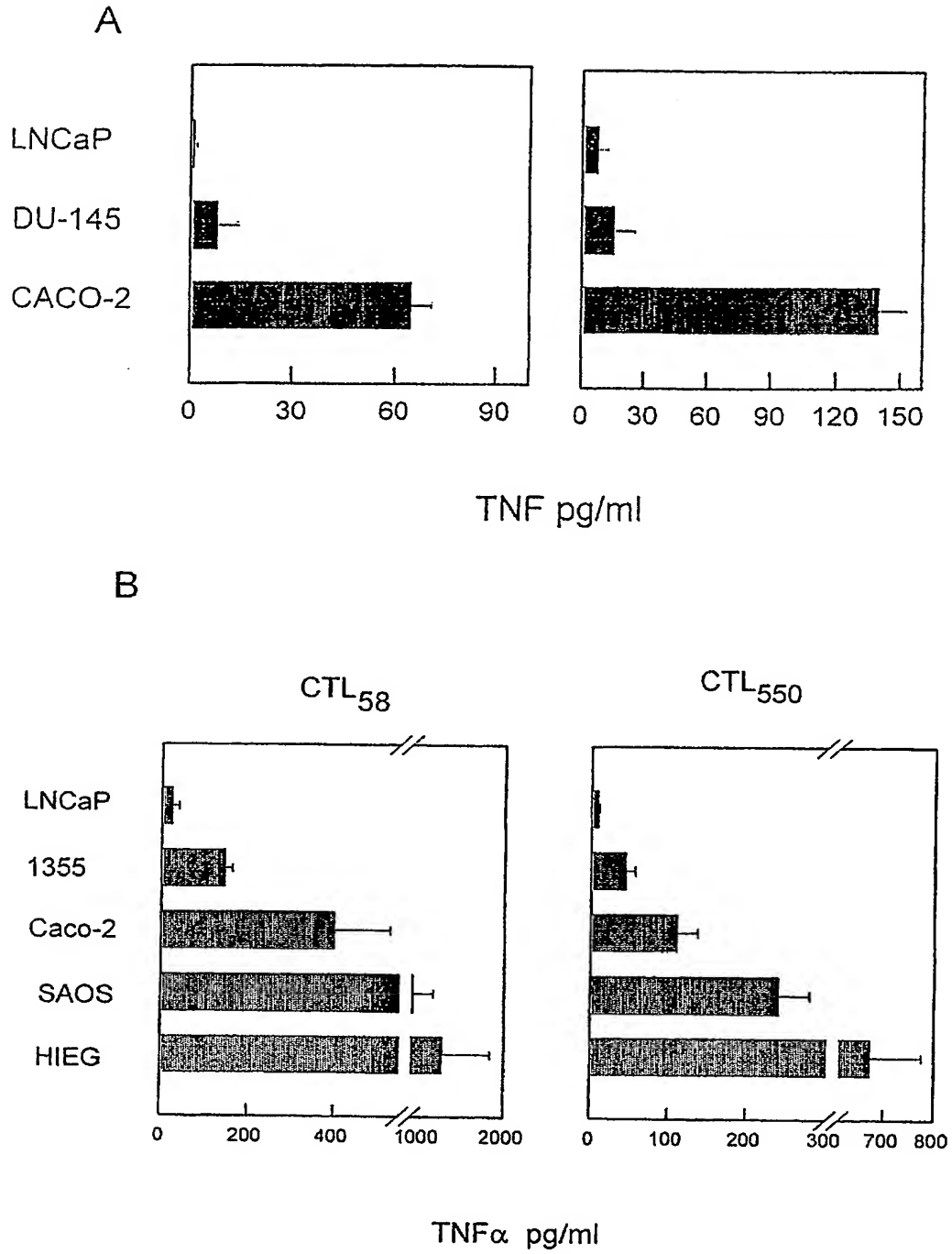


Fig.3

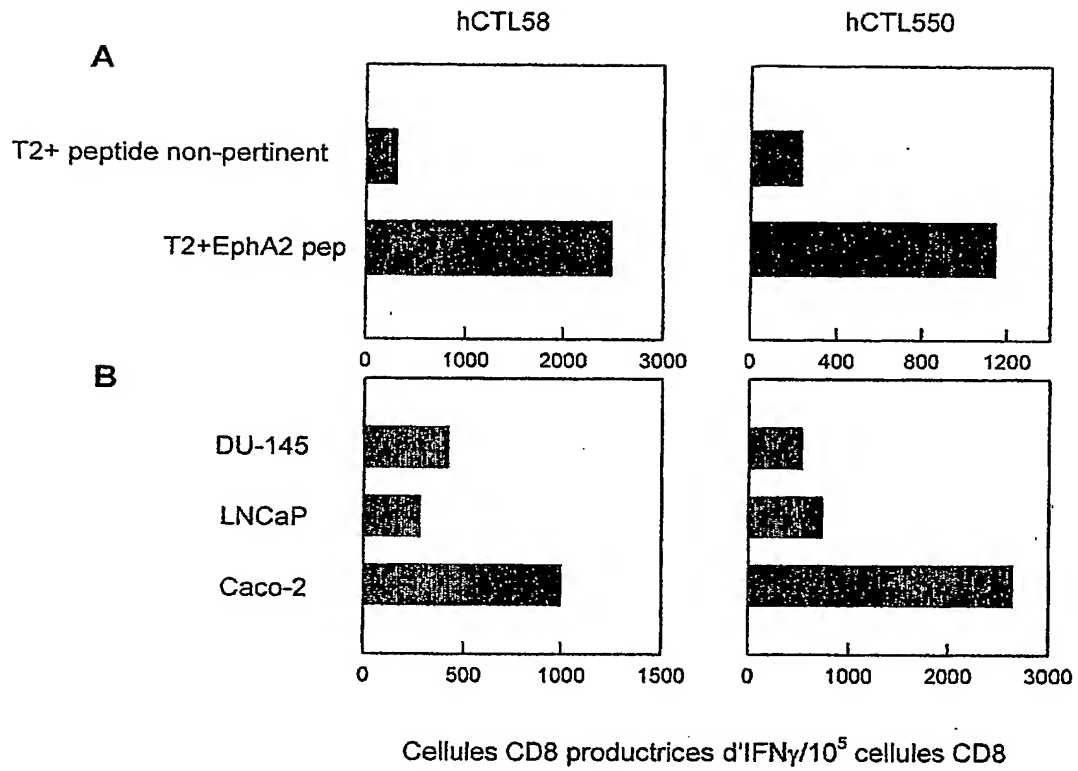


Fig.4

SEQUENCE LISTING

<110> INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche médicale)

IGR (Institut Gustave Roussy)

<120> Epitopes T de l'antigène EphA2

<130> MJPsts598/69FR

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ile Met Asn Asp Met Pro Ile Tyr Met
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Leu Ala Gly Val Gly Phe Phe Ile
1 5

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.. / 1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPah598/69FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0205048
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) EPITOPES T DE L'ANTIGENE EPHA2		
LE(S) DEMANDEUR(S) : CABINET ORES 36, rue de St Pétersbourg 75008 PARIS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	KOSMATOPOULOS
	Prénoms	Kostas
Adresse	Rue	70, rue du Javelot
	Code postal et ville	75013 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	ALVES
	Prénoms	Pédro
Adresse	Rue	10, sentier des Voisinoux
	Code postal et ville	91210 MEUDON
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 10 Avril 2003 Béatrice ORES (n° 92-4046)		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.